

Imunositokimia Streptavidin Biotin: Deteksi Dini *Viral Nervous Necrosis Virus* pada Lendir Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Immunocytochemistry Streptavidin Biotin: Early Detection of Viral Nervous Necrosis Virus in the mucous of the Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)

Putu Eka Sudaryatma, Artanti Tri Lestari, Ni Luh Sunarsih,
Ketut Sri Widiarti, Sulis Nur Hidayah, Didik Srinoto

Laboratorium Uji
Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan kelas I Denpasar
Email: eka_narita@yahoo.com

Abstract

Kerapu macan (Epinephelus fuscoguttatus) is one of the *kerapu* fishes that has been successfully bred by the farmers. The survival rate of the fish reaches up to the 40% at the fish hatchery of the home industry of in Bali. The disease in which may cause significant mortality in *kerapu* fish, especially for the larvae and juveniles is viral nervous necrosis (VNN). We therefore developed and applied the immunological diagnostic approach of immunocytochemistry technique of streptavidin biotin (SB) for early detection of VNN. Mucous samples of VNN infected- *kerapu* fish *in vivo* were firstly detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the presence of DNA VNN. If it is RT-PCR-positive VNN, the mucous samples were then tested by SB. Results of the present study indicated that the VNN virus could be detected with SB technique within only 24 hours post infection. It was concluded that rapid and accurate SB technique is suitable and appropriate to be applied for routine control and prevention national program in the Fish Quarantine for Indonesia because no need of fish sacrifice, and scientific, law and international accepted, and even no hazardous environmental contamination.

Keywords: *kerapu macan (Epinephelus fuscoguttatus)*, VNN, mucous, SB, early detection

Abstrak

Kerapu macan (Epinephelus fuscoguttatus) merupakan salah satu diantara ikan *kerapu* yang berhasil dibudidayakan oleh petani petambak dan tingkat keberhasilan mencapai 40% pada penetasan *kerapu* industri skala rumah tangga di Bali. Virus *viral nervous necrosis* (VNN) merupakan penyebab kematian massal ikan *kerapu*, terutama larva dan juvenil. Pada penelitian ini, dikembangkan dan diaplikasikan uji imunositokimia streptavidin biotin (SB) untuk diagnosis dini VNN. Sampel (lendir) ikan *kerapu* yang diinfeksi virus VNN *in vivo*, diuji *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Lendir yang positif DNA VNN dengan RT-PCR, selanjutnya diuji SB. Hasil penelitian ini membuktikan, bahwa virus VNN dapat dideteksi pada lendir ikan *kerapu* macan tersebut yang terinfeksi virus VNN 24 jam sebelumnya. Disimpulkan, bahwa uji SB yang cepat dan akurat adalah tepat dan cocok untuk diaplikasikan dalam rangka program rutin kontrol dan pencegahan VNN di Karantina Ikan Indonesia karena dapat dilakukan tanpa mematikan ikan, diterima secara ilmiah, hukum dan internasional, dan bahkan tidak mencemari lingkungan hidup.

Kata kunci: *kerapu macan ((Epinephelus fuscoguttatus)*, VNN, lendir, SB, diagnosis dini

Pendahuluan

Pencanangan Indonesia sebagai penghasil produk kelautan dan perikanan terbesar tahun 2015 oleh Kementerian Kelautan dan Perikanan memacu seluruh kegiatan budidaya, terutama perairan laut yang dapat dimanfaatkan untuk pengembangan usaha budidaya ikan yang diperkirakan mencapai tiga juta hektar (Sunaryanto *et al.*, 2001). Usaha pengembangan potensi perairan selain untuk memenuhi kebutuhan konsumsi masyarakat yang dapat mensejahterakan, juga dapat menggali potensi alam yang baru sehingga terjadi pelestarian lingkungan yang berkesinambungan.

Salah satu potensi perairan laut yang sudah dikembangkan dan mulai menunjukkan pasar internasional adalah ikan kerapu. Ikan kerapu tersebar luas di perairan yang berkarang di daerah tropis maupun subtropis. Beberapa jenis ikan kerapu yang sudah menjadi sasaran budidaya adalah kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*), kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu sunu (*Epinephelus leopardus*) dan kerapu lumpur (*Epinephelus coioides*). Jenis kerapu tersebut memiliki nilai jual yang tinggi dan untuk proses budidayanya hanya diperlukan dan digunakan komponen-komponen lokal.

Kerapu macan termasuk salah satu diantara kerapu yang berhasil dibudidayakan dengan *survival rate* mencapai 40% (Anonim, 1998), pada *hatchery* skala rumah tangga di Bali, ketersediaan benih ikan kerapu selalu kontinyu karena tidak terpengaruh musim. Dengan keunggulan yang maksimal maka spesies tersebut sudah dapat menembus pasar internasional yang banyak dilalulintaskan antar daerah untuk mencukupi pasokan benih dan antar

negara untuk kebutuhan konsumsi.

Budidaya kerapu macan tidak lepas dari faktor penyakit yang dapat menyerang dan menggagalkan hasil budidaya. Salah satu penyakit yang telah dilaporkan oleh para peneliti adalah *viral nervous necrosis* (VNN) yang dapat menyebabkan kematian massal pada ikan kerapu, terutama pada stadia larva dan juvenil. Di Indonesia kejadian penyakit VNN ditemukan pertama kali di daerah Banyuwangi pada budidaya kakap putih dan ikan kakap tersebut tampak lesu, berenang berputar dengan perut di permukaan dan sering muncul ke permukaan dengan berenang secara vertikal (Koesharyani *et al.*, 1999). Gejala klinis yang tampak pada ikan kakap tersebut memiliki kesamaan dengan gejala klinis ikan yang terinfeksi VNN. Penyakit VNN dapat menyerang otak sehingga menyebabkan ikan berenang berputar, mengambang di permukaan dengan perut menghadap ke atas dan pigmentasi warna yang lebih gelap pada ikan. Pada histogram terlihat banyak ruang-ruang kosong pada otak, mata dan sumsum tulang belakang, hemoragis di hati dan limpa, infiltrasi heterofil dan sel-sel radang mononukleus. Menurut OIE (2006) deteksi VNN yang disarankan adalah dengan menggunakan teknik PCR, IFAT, ELISA dan imunohisto kimia.

Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar sebagai salah satu pintu keluar masuk komoditas ekspor berusaha mencegah penyebaran penyakit VNN pada benih kerapu macan. Frekuensi lalulintas komoditas benih kerapu yang tinggi menuntut Laboratorium Uji Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar untuk mengembangkan teknik

pendeteksi awal untuk penyakit VNN di *hatchery* agar dapat mencegah penyebaran penyakit pada benih yang dilalulintaskan. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan dan mengaplikasikan uji imunositokimia pada lendir kerapu macan sebagai uji diagnosa dini penyakit *viral nervous necrosis* (VNN).

Materi dan Metode

Bahan yang digunakan adalah kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dengan ukuran panjang 8-10 cm sejumlah 90 ekor, pakan ikan kerapu, air laut steril. Bahan imunokimia adalah **akuades**, *phospat buffer saline* (PBS), etanol absolut, metanol, *kit streptavidin-biotin*, antibodi poliklonal anti VNN, pewarna hematoksilin dan entelen. Bahan pemeriksaan RT-PCR VNN menggunakan *kit IQ-2000*, kloroform, isopronol, alkohol 75% dan 95%, DEPC, bahan-bahan amplifikasi, *nuclease free water*, agarosa, bufer TAE, ethidium bromida, aquades, kertas *gel doc print*, purifikasi virus pada sampel (lendir) dengan *kit high pure viral nucleic acid* (Roche®), sediaan inokulum virus VNN yang dimiliki oleh Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar.

Alat yang digunakan adalah bak ikan, ember, seser, termometer, refraktometer, sarung tangan, masker, papan bedah, mortar, *dissecting set*, *glass ware*, pipet mikro, tabung mikro 0,2 dan 1,5 ml, tip mikro, *sput* ukuran 1-5 ml, gelas benda, gelas penutup, *analitical balance*, *hot plate*, vorteks, *thermal blok*, *patsel*, rak tabung mikro, *deep freezer*, *freezer*, *thermalcycler*, elektroforesis dan UV *trans-illuminator*.

Metode Uji

1. Uji pendahuluan

Koleksi inokulum virus penyebab VNN yang dimiliki oleh Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Denpasar memiliki konsentrasi $9,25 \times 10^2$ µg/ml. Konsentrasi partikel VNN kemudian diencerkan menjadi $10^{1.5}$ µg/ml dan disuntikkan sebanyak 100 µl untuk setiap ikan. Menurut Kokawa *et.al.* (2008), LD_{50} dari homogen otak mengandung konsentrasi inokulum $10^{1.5} LD_{50}/100$ µl.

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui infektifitas koleksi inokulum virus penyebab VNN pada kerapu macan. Inokulum virus penyebab VNN diinfeksi ke kerapu sehat sebanyak 10 ekor untuk melihat patogenisitasnya. Kerapu macan terinfeksi VNN yang menunjukkan gejala klinis kemudian diambil organ-organnya, antara lain: mata, otak, otot, hati, limpa, jantung dan ginjal untuk diperiksa dengan tehnik RT-PCR dan imunohistokimia. Setelah dengan uji RT-PCR kerapu macan tersebut terdeteksi positif VNN, maka inokulum VNN yang telah digunakan untuk menginfeksi kerapu macan tersebut sebelumnya, selanjutnya digunakan untuk menginfeksi ikan kerapu pada uji utama.

2. Uji utama dan uji konfirmasi

Kerapu macan berukuran 8-10 cm diaklimatisasi selama sepuluh hari untuk mengetahui dan menentukan tingkat kesehatan kerapu macan. Untuk kontrol, kerapu macan sebanyak sepuluh ekor diperiksa dengan uji PCR dan imunohistokimia dan harus memiliki hasil negatif virus penyebab VNN. Kemudian, 35 ekor kerapu macan diinjeksi dengan inokulum virus penyebab

VNN sebanyak 100 µl dengan konsentrasi $10^{1.5}$ pada setiap ikan, yang diawali dengan mengusap permukaan ikan sebelum dan sesudah penyuntikan dengan kapas yang telah dibasahi etanol 70% (Kode A). Kerapu macan yang telah diinjeksi virus VNN kemudian dipelihara bersama 35 ekor kerapu macan sehat (Kode B) di dalam sebuah aquarium. Pengamatan gejala klinis dilakukan setiap 24 jam. Pemeriksaan virus pada lendir kerapu macan dilakukan dengan cara mengambil masing-masing lima ekor ikan kerapu Kode A dan lima ekor ikan kerapu Kode B. Pemeriksaan dilakukan dengan pengujian imunositokimia dan uji konfirmasi dengan RT-PCR. Sebelum dilakukan pemeriksaan RT-PCR, maka lendir terlebih dahulu dilakukan purifikasi virus.

3. Prosedur uji utama

3.1. Pemeriksaan lendir menggunakan teknik imunositokimia (*kit streptavidin-biotin*)

Lendir diambil dan dihomogenisasikan, diulas tipis di atas gelas benda dan dibiarkan mengering. Kemudian, sediaan apus lendir yang sudah kering tersebut difiksasi dengan metanol 15 menit, sesudah kering kemudian dilakukan pewarnaan imunositokimia dengan menggunakan tahapan pada *kit streptavidin-biotin*. Sesudah pewarnaan selesai kemudian ditetesi bahan perekat larut air, ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop cahaya. Hasil positif apabila dalam sediaan yang telah dilakukan pewarnaan *streptavidin-biotin* akan terlihat warna coklat keemasan.

3.2. RT-PCR menggunakan IQ-2000

a. Purifikasi RNA VNN (*kit high pure viral nucleic acid*) (Roche®)

Lendir tubuh ikan kerapu macan diambil sebanyak 200 µl, dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml dan dikerjakan sesuai dengan instruksi *kit high pure viral nucleic acid* (Roche®) sampai selesai. Elusi asam nukleus disimpan pada suhu -80 °C (sediaan). Untuk pemeriksaan RT-PCR digunakan 6 µl sediaan.

b. Pemeriksaan VNN menggunakan RT-PCR (*kit IQ-2000*)

Sampel yang digunakan untuk pengujian menggunakan kit IQ-2000 berbeda antara sampel yang berupa organ dan sampel yang berupa lendir. Untuk sampel yang berupa organ yang digunakan sebanyak 20 mg dan dilakukan ekstraksi sampai dengan rangkaian proses kit IQ-2000 selesai, sedangkan untuk sampel yang berupa lendir yang sudah melalui proses purifikasi RNA hanya digunakan 6 µg dan tidak dilakukan ekstraksi, langsung diamplifikasi sampai dengan rangkaian proses *kit IQ-2000* selesai dan dibaca menggunakan lampu UV *trans illuminator*.

4. Analisa data

Analisa hasil dilakukan secara deskriptif dengan membandingkan hasil pengamatan gejala klinis, hasil uji imunositokimia lendir yang dikonfirmasi dengan uji RT-PCR.

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, kerapu macan yang telah diinfeksi virus penyebab VNN pada uji utama menunjukkan gejala klinis berupa gerakan renang

abnormal, disorientasi lingkungan dan perubahan warna tubuh. Perubahan gerakan renang ikan kerapu macan yang sangat mudah dikenali sebagai akibat infeksi virus penyebab VNN adalah berenang berputar-putar dan vertikal, kehilangan disorientasi lingkungan, antara lain: menabrak-nabrakkan diri ke

dinding dan dasar aquarium dan warna tubuh yang lebih gelap. Dalam waktu tiga hari ikan berenang terbalik, kemudian akan berada di dasar aquarium yang disusul dengan kematian. Kejadian tersebut dapat dilihat pada ikan kerapu yang diinfeksi virus VNN (Tabel 1) dan yang dikohabitasi (Tabel 2).

Tabel 1. Pengamatan gejala klinis dan lesi patologis ikan kerapu yang diinfeksi virus penyebab VNN

Waktu (pasca injeksi)	Gejala klinis	Lesi patologis anatomis
24 jam	Ikan mulai berenang miring di permukaan, tetapi masih gesit dan warna tubuh memucat	Sirip ekor geripis, insang pucat, hati pucat, limpa bengkak
48 jam	Ikan berenang dipermukaan, berenang vertikal dan menabrakkan diri ke dinding aquarium, warna tubuh menggelap	Lesi di bawah mulut, sirip ekor geripis, insang pucat, limpa bengkak dan hemoragis, hati bengkak dan pucat
72 jam	Ikan berenang dengan tubuh terbalik, tidak ada refleks, banyak ikan yang sekarat dan sudah ada ikan yang mati	Sirip ekor geripis, lesi pada mulut, insang pucat, limpa bengkak kehitaman, ginjal bengkak, hati pucat dan rapuh, usus dilatasi

Tabel 2. Pengamatan gejala klinis dan lesi patologis anatomis ikan kerapu yang dikohabitasi

Waktu (pasca kohabitasi)	Gejala klinis	Lesi patologis anatomis
24 jam	Ikan berenang normal, gesit dan menggerombol di dasar aquarium	Warna tubuh terang, tidak ada lesi patologis anatomis organ internal
48 jam	Ikan mulai berenang miring di permukaan, tetapi masih gesit dan warna tubuh memucat	Sirip ekor geripis, insang pucat, limpa bengkak, hati bengkak
72 jam	Ikan berenang berputar-putar refleks sangat lambat, ikan mulai sekarat dan sudah ada yang berenang terbalik dengan bagian abdomen di atas	Sirip ekor geripis, lesi di mulut, insang pucat, gelembung renang dilatasi, limpa bengkak, ginjal bengkak, hati pucat dan rapuh, dan usus dilatasi

Yoshikoshi dan Inoue (1990) melaporkan, bahwa ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN akan mengalami perubahan gerakan berenang dan warna tubuh yang menggelap dan berenang berputar di permukaan. Perubahan gerakan renang tampak sangat jelas dengan adanya luka di bagian bawah mulut, keadaan tersebut menandakan bahwa ikan mulai kehilangan keseimbangan dalam berenang sehingga seringkali menabrakkan diri ke dinding dan/atau dasar aquarium. Benih ikan yang terserang VNN dapat berbeda menurut umurnya. Pada ikan kerapu yang berumur 45 hari sampai 4 bulan, ikan kerapu akan terlihat berdiam di dasar bak, berenang terbalik, gerakan lemah dan nafsu makan menurun drastis, serta warna kulit menjadi gelap.

Pada umumnya, 3 -5 hari setelah adanya gejala klinis ikan kerapu akan mati (Roza *et al.*, 2003).

Infeksi virus penyebab VNN pada ikan yang dilakukan melalui injeksi intra muskular sangat cepat menyebar dan menginfeksi inang melalui saraf perifer yang ada di otot, masuk ke dalam sistem saraf pusat dan mata dan mengakibatkan ikan kehilangan orientasi berenang dan disfungsi visual. Larva dan juvenil kerapu peka terserang VNN pada suhu 24,5° C – 26° C yang merupakan suhu optimal dalam proses infeksi VNN dan dapat menyebabkan kematian pada umur 7-45 hari karena sistem saraf yang masih sederhana.

Pada penelitian ini, nekropsi yang dilakukan pada ikan kerapu menunjukkan lesi patologis dengan perubahan insang pucat, limpa bengkak dan hemoragis, warna hati pucat dan konsistensinya rapuh, ginjal bengkak, gelembung renang dilatasi dan usus dilatasi (Gambar 1)



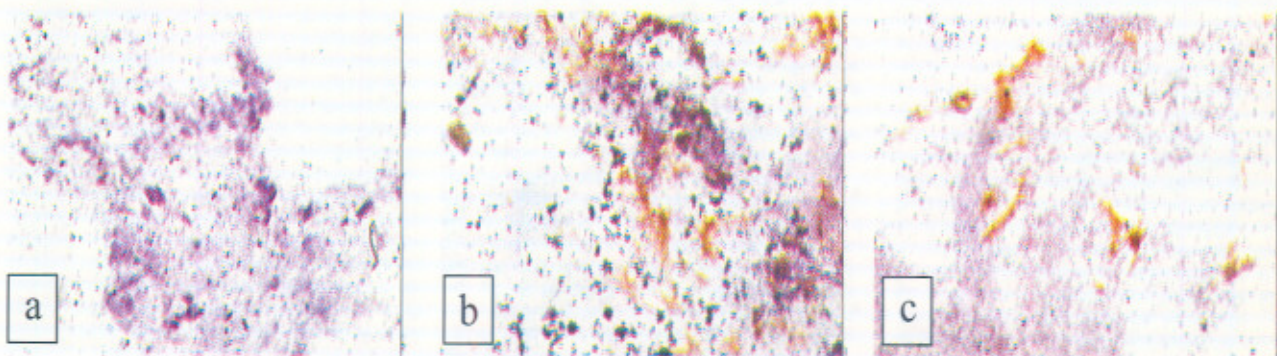
Gambar 1. Lesi patologis anatomis ikan kerapu macan 48 jam pasca infeksi VNN. Insang pucat dan berlendir, hati pucat, limpa membengkak dan usus kembung.

Lesi patologis anatomis yang sama dilaporkan oleh Gilda dan Leobert (2011). Ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN menunjukkan usus yang kosong dan berisi udara dan dilatasi gelembung renang. Perubahan pada organ internal, terutama hati dan limpa akan terjadi jika infeksi virus VNN melanjut akibat adanya viremia pada ikan yang terinfeksi virus penyebab VNN. Dilatasi usus ikan kerapu diakibatkan oleh adanya hasil fermentasi bakteri normal usus dan diikuti oleh adanya akumulasi cairan yang berwarna coklat kehijauan. Kejadian tersebut akibat gerakan peristaltik usus yang tidak teratur akibat dari kerusakan sistem saraf perifer oleh infeksi VNN. VNN bersifat neurotropik dan dapat ber-replikasi dalam saraf dan dapat secara cepat menyerang organ lain yang dilalui oleh sistem saraf perife (Korsnes, 2008).

Virus penyebab VNN dapat menginfeksi ikan melalui tiga cara yaitu: 1. Melalui sel-sel epitelia saluran pencernaan, 2. Melalui axon yang ada di permukaan sel dan 3. Melalui peredaran darah

(Korsnes, 2008). Ikan yang diinfeksi virus penyebab VNN melalui injeksi intra muskular menginfeksi ikan dengan cara mereplikasikan diri di dalam sitoplasma atau nukleus serabut otot skelet kemudian menyebar dan ber-replikasi di sistem saraf perifer dan selanjutnya virus akan langsung masuk ke dalam sistem saraf pusat. Ikan yang dikohabitasi dapat terinfeksi VNN akibat masuknya virus yang ada di air melalui kontak dengan permukaan tubuh (lendir, sirip dan otot), termasuk via oral sehingga akan dapat menginfeksi sel-sel epitelia epitelia sistem saluran pencernaan. Kejadian ini yang disebut "*water borne disease*". Virus yang masuk melalui permukaan tubuh dapat langsung bereplikasi di epitel permukaan saluran pencernaan dan masuk ke dalam sistem saraf pusat melalui sistem saraf perifer (*nervus Vagus*) (Korsnes, 2008).

Hasil pengamatan imunositokimia pada apus lendir kerapu macan yg diinjeksi inokulum virus penyebab VNN dan kerapu macan yang tertular VNN dengan kohabitasi dapat dilihat pada Gambar 2.



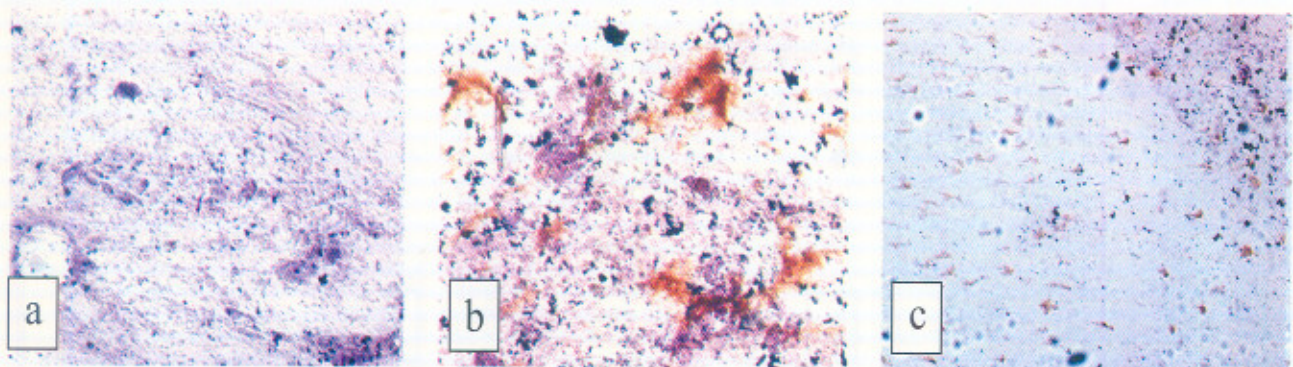
Gambar 2. Imunositokimia lendir Kerapu Macan 24 jam pasca infeksi VNN. a. Kontrol negatif, b. Kontrol positif dan c. Ikan kohabitasi (SB, 1000x.).

Uji imunositokimia pada apus lendir kerapu macan menunjukkan hasil imunositokimia positif pada 24 jam pengamatan. Reaksi positif pada ikan yang dikohabitasi dan ikan yang diinfeksi virus penyebab VNN menghasilkan reaksi spesifik antibodi-antigen yang terwarnai oleh kromogen, menunjukkan warna coklat-keemasan. Sedangkan, kontrol negatif tidak menunjukkan adanya warna coklat keemasan akibat tidak adanya reaksi antibodi-antigen yang dikehendaki. Hasil positif berarti, bahwa virus yang diinfeksi pada ikan sudah berada di air pemeliharaan dalam selang waktu 24 jam dan dapat langsung menularkan pada ikan sehat.

Keluarnya virus dari ikan yang diinfeksi dapat melalui feses, lendir dan insang. Feses merupakan hasil ekskresi dari pencernaan yang merupakan salah satu media pembawa virus yang berada di dalam saluran pencernaan. Virus dapat menginfeksi melalui saluran pencernaan dan selanjutnya menginfeksi sistem saraf perifer dan akhirnya virus VNN dapat menginfeksi serabut otot jantung

(niokardium) dan makrofag (Grotomol *et al.*, 1997). Chi *et al.* (2001) menemukan adanya reaksi positif imunohistokimia pada sel-sel epitelia saluran pencernaan ikan kerapu. Virus dapat berada pada insang karena sistem respirasi ikan yang memungkinkan virus yang berada di darah dapat menginfeksi sel-sel epitelia lamela sekunder insang, terutama dengan adanya badan-badan inklusi intranukleus setelah 24 jam terinfeksi oleh virus penyebab VNN. Virus VNN dapat berada di darah dalam waktu 12-57 jam, yang dibuktikan berdasarkan hasil uji imunositokimia *streptavidin biotin* sediaan darah apus ikan kerapu macan. Selain itu, dengan uji imunohistokimia *streptavidin biotin* virus VNN dapat ditemukan pada limpa, jantung, hati dan ginjal (Artanti, 2010).

Keberadaan virus penyebab VNN pada lendir ikan dapat ditemukan 24 jam setelah infeksi dan bertahan selama 48 jam, yang ditunjukkan pada pewarnaan imunositokimia lendir ikan (Gambar 3).



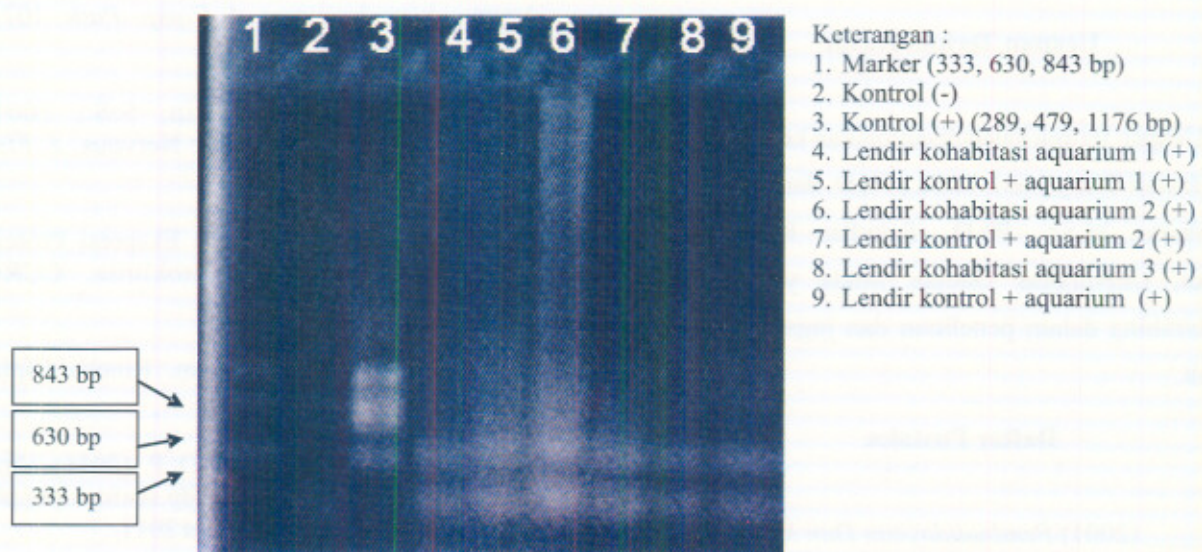
Gambar 3. Imunositokimia lendir Kerapu Macan 48 jam pasca infeksi VNN. a. Kontrol negatif, b. Kontrol positif dan c. Ikan kohabitasi (SB, 1000x.).

Lendir merupakan salah satu pertahanan tubuh ikan, sehingga memungkinkan sebagai tempat utama terjadinya penularan virus penyebab VNN. Pada penyakit *water borne diseases* infeksi terjadi pada lapisan permukaan terluar ikan (lendir) dan saluran pencernaan (Mori *et al.*, 2005). Nguyen *et al.* (1996) berhasil mengidentifikasi keberadaan virus VNN pada sel-sel epitelia kulit larva kerapu (*striped jack*) yang terinfeksi akut virus VNN.

Ikan yang dikohabitasi dapat terinfeksi virus penyebab VNN dengan masuknya virus yang ada di air melalui kontak dengan permukaan tubuh (lendir, sirip dan otot) termasuk sel-sel epitelia permukaan dari sistem pencernaan, kejadian ini yang disebut "*water borne disease*". Virus yang masuk melalui permukaan tubuh dapat langsung ber-replikasi di sel-sel epitelia saluran pencernaan dan masuk ke dalam sistem saraf pusat melalui transfer dari sistem

saraf perifer (nervus Vagus) (Korsnes, 2008). Virus dapat bertahan hidup pada mikroorganisme air, seperti algae, parasit dan debris nekrotik sel-sel epitelia. Selain itu, protein sisa pakan pada budidaya ikan dapat digunakan oleh virus sebagai tempat ber-replikasi. Korsnes (2008) melaporkan adanya *betanodavirus* pada mikroorganisme perairan laut dan ikan yang tidak merupakan inang spesifik dari VNN. Hal tersebut dapat disebabkan oleh keadaan VNN yang stabil di lingkungan dan dapat bertahan hidup pada suhu ekstrem dan pemberian desinfektan (Arimoto *et al.*, 1996).

Pengujian VNN yang sudah dilakukan dengan imunositokimia dilanjutkan verifikasi dengan menggunakan tehnik *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) yang bertujuan untuk konfirmasi hasil uji imunositokimia. Hasil uji RT-PCR kerapu macan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil pemeriksaan RT-PCR lendir ikan kerapu macan jam ke-24, 48 dan 72 pasca infeksi VNN

Hasil uji RT-PCR menunjukkan, bahwa lendir ikan kerapu macan pada jam ke-24 sampai jam ke-72 pasca infeksi VNN semuanya positif VNN. Hal tersebut membuktikan, bahwa dapat dilakukan deteksi VNN pada 24 jam pasca infeksi VNN. Berdasarkan hasil Uji immunositokimia dan pemeriksaan RT-PCR yang menunjukkan hasil positif, maka untuk diagnosa dini VNN dapat digunakan uji immunositokimia. Teknik immunositokimia *streptavidin biotin* dapat diaplikasikan untuk deteksi dini virus VNN secara cepat, tepat dan akurat sesuai dengan petunjuk dari OIE dan juga memiliki kelebihan karena dapat diaplikasikan pada sampel (spesimen) ikan tanpa melukai atau bahkan tanpa mematikan ikan kerapu macan bersangkutan, sehingga dapat mengontrol dan mencegah penyebaran penyakit VNN lebih awal, atau bahkan eradikasi VNN, serta sekali gus mampu mencegah kemungkinan terjadinya pencemaran lingkungan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. drh. Hastari Wuryastuti, M.Sc., Ph.D. dan Prof. drh. R. Wasito, M.Sc., Ph.D., Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada yang telah membimbing dalam penelitian dan juga penulisan naskah.

Daftar Pustaka

- _____. (2001) *Pembudidayaan Dan Manajemen Kesehatan Kerapu*. Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center (SEAFDEC). Iloilo, Philippines.
- _____. (2006) *Manual IQ 2000. Farming Intelligene Tech. Corp.* <http://www.iq2000kit.com>. Diakses pada tanggal 26 Maret 2012.
- Al Qodri, A. H., Sudjiharno & Anidiastuti, 2004. *Pemilihan Lokasi Pembenihan Kerapu*. Balai Budidaya Laut Lampung. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan, Lampung. Hal. 15 dan 19.
- Anonimus. (2008) *The Circulatory System In Fish*. <http://www.earthlife.com>. Diakses pada tanggal 10 Maret 2012.
- Antoro, S., Sarwono, H. A. and Sudjiharno. (2004) *Biologi Kerapu Pembenihan Kerapu*. Balai Budidaya Laut Lampung. Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya. Departemen Kelautan dan Perikanan, Lampung.
- Arimoto, M, Sato, J., Maruyama, K., Mimura G. and Furusawa, I. (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aqua. J.* 143:15-22.
- Artanti, T. (2010) Nilai Diagnostik Immunositokimia *Viral Nervous Necrosis* (VNN) pada Kerapu Macan. Laporan Uji Coba Balai Karantina Ikan Ngruh Rai. Jakarta.
- Brown, C.C., Olander H.J. and Senne D.A. (1992) A Pathogenesis Study Of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H₅N₂) In Chickens, Using Immunohistochemistry. *J. Comp. Path.* 107 : 341-348.
- Chi, S.C., Lo, B.J. and Lin, S.S., 2001. Characterization Of Grouper Nervous. *J. Fish Dis.* 24: 3-13.
- Firiasari, A. (2009) Pengamatan Ekspresi Protein Dengan Metode Immunositokimia. CCRC Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Fujaya, Y. (2004) *Fisiologi ikan*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Gilda, D, Lio-Po and Leobert D P. (2011) *Viral Disease Chapter I*. <http://rfdp.seafdec.org.ph>. Diakses pada tanggal 25 Maret 2011.
- Grotmol, S., Bergh O. & Totland, G.K. (1999) Transmission Of Viral Encephalopathy And Retinopathy (Ver) To Yolk-Sac Larvae Of The Atlantic Halibut *Hippoglossus Hippoglossus*: Occurrence Of Nodavirus In Various Organs And A Possible Route Of Infection. *Dis. Aqua. Org.* 36: 95-106.

- Grotmol S., Totland, G.K., Thorud, K. and Hjeltne, B.K. (1997) Vacuolating Encephalopathy And Retinopathy Associated With A Nodavirus-Like Agent: A Probable Cause Of Mass Mortality Of Cultured Larval And Juvenile Atlantic Halibut *Hippoglossus Hippoglossus*. *Dis. Aqua. Org.* 29: 85-97.
- Katayama, M. (1960) *Fauna Javonica Serranidae (Piscea) Biogeographical Society Of Japan*. Tokyo New Service. Ltd. Ginza Nishi. Japan.
- Kjetil, K. (2008) *Nervous Necrosis virus (VNN) in farmed Norwegian fish species*. Thesis of Philosophiae Doctor (PhD) University of Bergen. Norway: Bergen.
- Koesharyani I., Zafran and Yuasa, I. (1999) Deteksi Viral Nervous Necrosis (Vnn) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (Pcr) Pada Ikan Kerapu Bebek. *Pros.Sem.Nas.Pen. Dis. Tek. Budidaya Laut dan Pantai* : 237-240.
- Kokawa, Y., I. Takami, T. Nishizawa and M. Yoshimizu. (2008) Amixed Infection In Sevenband Grouper *Epinephelus Septemfasciatus* Affected With Viral Nervous Necrosis (Vnn). *Aquaculture* 284; 41-45.
- Mori, K., Sugaya, E., Nishioka, T., Gomez, D.K., Fujinamy, Y., Arimoto, M., Okinaka, Y. and Nakai, T. (2005) *Detection of betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture*. In: EAFF 12th International Conference Diseases of Fish and Shellfish, 11-16 September 2005, Copenhagen, Denmark.
- Nguyen, H.D., Nakai, T. and Muroga, K. (1996) Progression of *Striped Jack Nervous Necrosis Virus (NNV)* infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Dis. Aqua. Org.* 24: 99-105.
- OIE (2006) *Manual of diagnostic for aquatic animals*. France.
- Rantam, F.A. (2003) *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Roza, D., Johnny and Yuasa K. (2003) Viral diseases of grouper in Indonesia. Makalah pada Training on Grouper Hatchery Seed Production. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol – NACA Bangkok. Gondol 1 – 21 Mei 2003.
- Sunaryanto, Sulisty, Chaidir, I. and Sudjiharno (2001) Pengembangan Teknologi Budidaya Kerapu : Permasalahan Dan Kebijakan. Prosiding lokakarya nasional. Pengembangan agribisnis kerapu : Peningkatan daya saing agribisnis kerapu yang berkelanjutan melalui penerapan IPTEK. Jakarta.
- Wasito (1995) Penerapan Uji Immunologi Untuk Mendiagnosa HPIK Pada Kegiatan Lalu Lintas Ikan. Seminar Nasional Hama dan Penyakit Ikan Karantina dan Daerah penyebarannya. Jakarta.
- Weeks, B.A. and Warinner, J.E. (1986) *Functional Evaluation Of Macrophages In Fish From A Polluted Estuary*. *Vet. Immunol.. Immunopathol.* 12: 313-320.
- Yoshikoshi, K. and Inoue, K. (1990). *Viral Nervous Necrosis in hatchery larvae and juvenils of Japanese parrotfish, Oplegnathus fasciatus (Temminck & Schelgel)*. *J. Fish Dis.* 13: 69-77.
- Yuasa, K., Koesharyani I., Roza D., Mahardika K., Johnny F. and Zafran. (2001) *Manual For PCR Procedure : Rapid Diagnosis on Viral Nervous Necrosis (VNN) in Grouper: Lolitkanta – JICA Booklet* 13: 35 – 37.